УДК 573.4:614.48:615.014.456:612.014.464: 612.392.83

Сизоненко М.Н., Катунина Л.С.
(ФГАОУ ВПО «Северо-Кавказский федеральный университет», ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт»)

ОЗОНИРОВАНИЕ КАК БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПРИЕМ ПРИ ПРИГОТОВЛЕНИИ НОВОГО СТИМУЛЯТОРА РОСТА МИКРООРГАНИЗМОВ «СРМП»

Ключевые слова: озонирование, перепелиные яйца, стимулятор роста микроорганизмов.

В связи с ухудшением качества микробиологических питательных сред, идёт постоянный поиск новых стимуляторов роста микроорганизмов, способных решить эту проблему [2, 12].

На сегодняшний день известны биологически активные вещества, применяющиеся в качестве стимуляторов роста микроорганизмов, которые за счет добавления в небольших количествах не влияют на состав среды, действуя как катализаторы [11]. Для каждого конкретного микроорганизма известен определенный спектр химических или органических компонентов, являющихся стимуляторами их роста. Однако существуют и универсальные стимуляторы роста, состав которых подходит многим микроорганизмам.

Существует ряд требований и характеристик, предъявляемых к стимуляторам роста, достижение которых возможно лишь при оптимальной биотехнологии. Важнейшими, на наш взгляд, характеристиками являются высокая концентрация биологически активных, в том числе ростостимулирующих компонентов на единицу объема, а также стопроцентная стерильность конечного продукта. Обеспечение данных требований к стимуляторам полностью зависит от исходного сырья и биотехнологических манипуляций, проводимых с ним. В то же время, в процессе многочисленных манипуляций с сырьем, направленных на повышение его биологической активности, возможно дополнительное загрязнение, что может негативно отразиться на чистоте конечного продукта. Поэтому необходим поиск технологических манипуляций, способных не только обеспечить стерильность сырья, но и не противоречащих, а даже способствующих повышению и накоплению биологически активных веществ в сырье.

С учётом вышеизложенных позиций коллективом авторов ПНИЛ «Экспериментальной иммуноморфологии, иммунопатологии и иммунобиотехнологии» разработан новый стимулятор роста микроорганизмов «СРМП» (стимулятор роста микроорганизмов перепелиный). Сырьем для стимулятора послужили перепелиные яйца, выбор которых обусловлен в первую очередь их богатым химическим составом, который соответствует питательным потребностям большинства микроорганизмов. Перепелиные яйца являются богатым источником белка, витаминов A, B1, B2, PP, минеральных веществ, таких как кальций, калий, фосфор, железо, медь, содержат в своем составе большой перечень аминокислот: лизин, цистин, метионин, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, триптофан, тирозин, треонин, глицин, гистидин, - и по всем перечисленным показателям превосходят куриные яйца [10, 13].

При инкубации яиц, сопряженной с целым рядом манипуляций, направленных на технологически обоснованную модуляцию процессов метаболизма эмбриона, была получена активированная эмбрионально-яичная масса, являющаяся основным компонентом стимулятора роста микроорганизмов. Технологические приемы, положенные в основу ее приготовления, ранее предложены профессором Тимченко Л.Д. при получении эмбрионально-яичной массы кур, использованной для приготовления стимулятора роста микроорганизмов «ЭСРМ», иммуномодуляторов и стимуляторов физиологических процессов в организме животных [14, 4, 16, 17].

Эмбрионально-яичная масса представляет собой полноценную в химическом отношении субстанцию, экологически чистую, так как отбор свежих неинфицированных яиц обязательно проводится из благополучного хозяйства по основным эпизоотически угрожающим заболеваниям птицы, а их инкубация, являющаяся одним из важнейших биотехнологических

этапов, проводится в лабораторных условиях под строгим контролем. Однако, даже при соблюдении вышеуказанных условий, возможность инфицирования посторонней, в том числе условно - патогенной микрофлорой, не исключается. При этом инкубационные яйца могут быть инфицированы через скорлупу экзогенным путём из внешней среды, а также трансовариально.

В связи с интенсивным ростом и развитием, эмбрионы очень чувствительны к изменениям условий внешней среды, поэтому массовое инфицирование ведет к замедлению развития и гибели значительного количества эмбрионов [9]. Этот факт крайне важен при приготовлении «СРМП», так как от жизнеспособности эмбрионов и их качества зависят качество и свойства самого продукта. Поэтому дезинфекция сырья, в частности яйца, это немаловажный этап в технологическом цикле получения препарата.

Обычно в птицеводстве инкубационные яйца дезинфицируют парами формальдегида, который получают из технического формалина, являющегося канцерогеном [7]. Такая обработка яиц может привести к патологическим изменениям внутренних органов эмбрионов, оказать тератогенный эффект и вызвать их повышенную смертность [6, 8]. Применяют и другие дезинфицирующие средства - химические реагенты (хлор, моющие препараты — поверхностно активные вещества и др.), которые обладают кумулятивными свойствами, что может приводить к побочным негативным эффектам в развитии эмбриона [5]. Для дальнейшего использования в биотехнологическом цикле производства «СРМП» отбираются только живые и здоровые эмбрионы. Также применение любых дезинфектантов, независимо от их влияния на сам эмбрион, увеличивает вероятность попадания самих химических реагентов в стимулятор роста микроорганизмов со скорлупы яйца. Все вышеперечисленные позиции при приготовлении стимулятора роста недопустимы, так как токсические и химические вещества, накапливающиеся в яйце и на скорлупе, не должны попасть в конечный продукт.

В связи с вышеизложенным, в биотехнологическом цикле получения стимулятора роста микроорганизмов «СРМП», по нашему мнению, необходимо использование более щадящих способов дезинфекции. Поэтому, в качестве альтернативного метода дезинфекции перепелиных яиц при производстве стимулятора роста микроорганизмов нами был выбран метод озонирования.

Озон обладает мощным бактерицидным действием и уничтожает большинство микроорганизмов, в том числе патогенных. Данный метод предполагает использование незначительной дозировки озона, прост и экономичен. Благодаря своим характеристикам использование озона получило применение на птицефабриках в качестве метода дезинфекции воздуха в птичниках, кормов, инкубационных куриных яиц, товарных яиц с целью увеличения сроков их сохранности, а также для повышения выводимости [1, 3]. Кроме того, имеются отдельные сообщения о том, что озонирование воздуха усиливает дыхательный обмен эмбрионов, озон обладает биостимулирующим эффектом, стимулирует эмбриональное развитие и повышает процент выживаемости эмбрионов [5]. Однако есть данные и о негативном влиянии озона в определенных дозах на куриный эмбрион [15]. Все сообщения единичны и спорны и требуют глубокого изучения и подтверждения, а данный метод требует совершенствования, заключающегося в тщательной отработке дозировки озона.

К сожалению, на сегодняшний день нет рекомендаций по методике озонирования перепелиных яиц при инкубации, а тем более с биотехнологической целью. Поэтому необходимо подтверждение наличия бактерицидного эффекта, не сопровождающегося отрицательным влиянием на развитие и жизнеспособность эмбриона в выбранной дозировке. Это определило цель нашей работы. Одним из важных критериев исследования мы считаем получение сведений о динамике исчезновения микрофлоры со скорлупы перепелиных яиц в процессе их озонирования.

Инкубацию яиц проводили в течение 9 суток, после чего яйца вскрывались и эмбрионы отбирались для дальнейших манипуляций в цикле приготовления стимулятора роста микроорганизмов. После вскрытия оценивался внешний вид эмбрионов и их жизнеспособность. Для озонирования яиц использовали бытовой озонатор «Гроза» производства ООО «Дон» г. Томск. Перед закладкой в инкубатор с яиц были сделаны смывы, затем яйца были подвергнуты озонированию в течение 15 минут (2,1 г/м3 озоно-кислородной смеси) в закрытом полиэтиленовом мешке объёмом 35л и вновь сделаны смывы. Поскольку, после обработки озоном не исключается активизация роста некоторых микро-

организмов при дальнейшей инкубации, а также дополнительное обсеменение микрофлорой из окружающей среды при последующих технологических манипуляциях с яйцами, по нашему мнению, необходимо повторное озонирование для достижения максимальной чистоты яиц.

В связи с этим, последующее озонирование яиц проводилось на третьи, пятые, седьмые и девятые сутки инкубационного периода в течение 15 минут. Смывы со скорлупы яиц производились на перечисленные сутки до озонирования яиц, с последующим высевом на чашки Петри с агаром Хоттингера и культивированием в термостате при 37 0С. Результаты исследований показали, что смывы с яиц перед инкубацией до озонирования обеспечили на чашках Петри сплошной рост белого и желтоватого цвета крупных и мелких колоний микроорганизмов (рис.1 слева).

При оценке внешнего вида колоний,

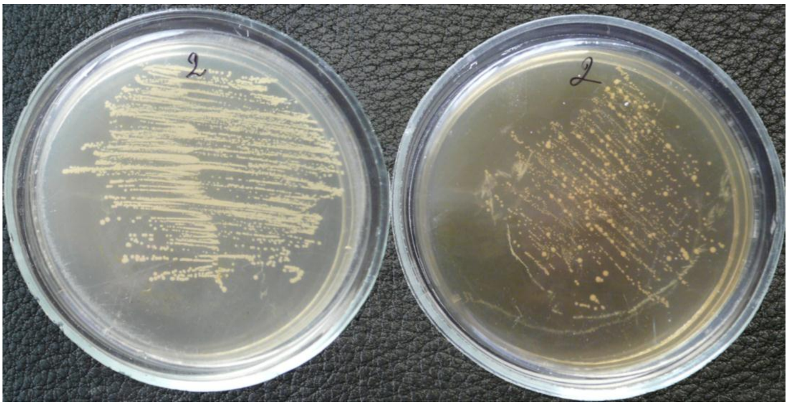

Рис.1.Рост микрофлоры смывов до инкубации и озонирования яиц (слева) и рост микрофлоры смывов на третьи сутки инкубации яиц (справа).

микроскопии мазков, а также при определении сахаролитической активности на средах Гисса было идентифицировано 3 типа микроорганизмов: Proteus vulgaris, Staphylococcus aureus и Escherichia coli. Микроорганизмы рода Proteus на агаре Хоттингера дали типичный рост крупных с ровными краями колоний беловатого цвета, в мазках представляют грамотрицательные палочки с закругленными концами, на средах Гисса ферментируют с образованием кислоты и небольшого количества газа глюкозу, сахарозу, мальтозу. Микроорганизмы рода Staphylococcus на агаре Хоттингера в виде круглых непрозрачных колоний желтоватого цвета, в мазках как грамположительные, правильной формы шаровидные клетки, на средах Гисса ферментируют с выделением кислоты без газа глюкозу, маннозу, сахарозу, лактозу, маннит и мальтозу. Escherichia coli на агаре Хоттингера образует круглые выпуклые полупрозрачные колонии, в мазках в виде грамотрицательных одиночных коротких палочек с закругленными концами, ферментирует с образованием кислоты и газа глюкозу, маннозу, лактозу, маннит, арабинозу и мальтозу. Таким образом, при идентификации внешних признаков: колоний, микроскопии мазков, а также при определении сахаролитической активности, все три микроорганизма проявили свои типичные признаки.

Смывы, сделанные сразу после обработки яиц озоном, не обеспечили роста микрофлоры, что свидетельствует о моментальном бактериостатическом или бактерицидном действии озона.

На чашках Петри со смывами, высеянными на третьи сутки инкубации перед озонированием, визуально установлено снижение числа колоний вышеперечисленных микроорганизмов по сравнению с предыдущим высевом (рис.1 справа). На пятые сутки - колонии протея выявлены не были, при общем снижении количества колоний кишечной палочки и стафилококка до 290,2 ± 18,0 колоний (рис.2 слева). К седьмым суткам исчезли колонии кишечной палочки, дали рост лишь отдельные колонии стафилококка в виде мелкой росы желтоватого цвета (рис.2 справа), к девятым суткам - смывы на чашках Петри не обеспечили роста микрофлоры.

При вскрытии инкубационных яиц на девятые сутки выживаемость эмбрионов

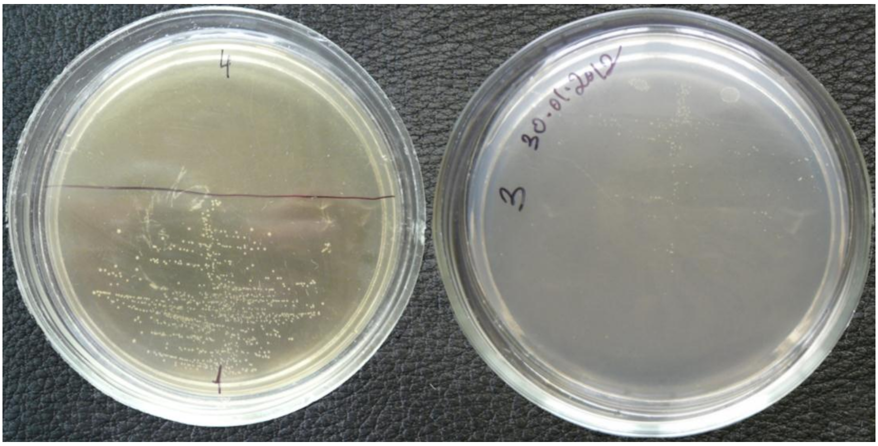

Рис.2. Рост микрофлоры смывов на 5 сутки инкубации яиц (слева) и рост микрофлоры смывов на 7 сутки инкубации яиц (справа).

составила 95%, внешних патологических изменений не наблюдалось, что свидетельствует об отсутствии отрицательного влияния озона на их жизнеспособность.

Изготовленный стимулятор роста «СРМП» на основе активированной эмбрионально-яичной массы, полученной с применением озонирования в качестве биотехнологического приема, был апробирован при культивировании вакцинного штамма АУФ Listeria monocytogenes и показал высокий стимулирующий эффект, обеспечив прирост бактериальной массы в 1,5 раза.

Таким образом, пятикратное озонирование (до инкубации и на 3, 5, 7, 9 сутки) является эффективным приемом, который обеспечивает обеззараживание скорлупы инкубационных яиц, а также исключает дальнейшее ее обсеменение в технологическом цикле получения стимулятора роста «СРМП» на всех этапах инкубации. Кроме того, озон не оказал негативного влияния на качество эмбриона, что позволило получить качественный конечный продукт.

Резюме: Перепелиные инкубационные яйца, являющиеся сырьем для стимулятора роста микроорганизмов «СРМП», обеззараживали методом озонирования. Прослежена динамика исчезновения микрофлоры в смывах скорлупы яиц по мере озонирования на разные сутки инкубации. Установлено, что пятикратное озонирование яиц (до инкубации, и на 3, 5, 7, 9 сутки) является эффективным приемом, обеспечивающим обеззараживание их скорлупы и исключающим дальнейшее ее обсеменение в технологическом цикле получения стимулятора роста «СРМП» на всех этапах инкубации при 95%-ой выживаемости эмбрионов.

SUMMARY
Quail hatching eggs, which are raw materials for stimulator of the growth of microorganisms «SRMP», decontaminated by ozonation. The dynamics of the disappearance of the microflora in the eggshells lavages after ozonation on different day of incubation traced. Established, that fivefold ozonation eggs (before incubation, and on 3th, 5th, 7th, 9th day) is an effective technique that provides disinfection of their shell and preclude their further colonization during the technological cycle of the obtaining a growth stimulator «SRMP» in all stages of incubation at 95% survival rate of embryos.

Keywords: growth factor of microorganisms, quail eggs, ozonization.

Литература

1.Вандышев, А. Установка для озонирования яиц в инкубаторе / А. Вандышев // Птицеводство.-1995.-№5.-С.6-7.

2.Геладзе, В.Ш. Изыскание универсальных питательных сред для культивирования аэробных и анаэробных микроорганизмов / В.Ш. Геладзе, В.И. Ситьков, В.И. Заерко, И.К. Тутов, Р.Г. Колпакова // Диагностика, лечение и профилактика заболеваний сельскохозяйственных животных: Сб. науч. тр. / Ставроп. ГСХА - Ставрополь, 1998. – С. 30-31.

3.Дель, В. Дезинфекция яиц озоном / В. Дель, В.Ивашкин // Птицеводство.-1995.-№5.-С.7-8.

4.Дьякова, С.П. Динамика некоторых показателей иммунного статуса у овец в постнатальный пе-

риод и эффект иммуностимуляции / С.П. Дьякова, Л.С. Ермолова, Л.Д. Тимченко, И.В. Ржепаковский // Сельскохозяйственная биология. Серия «Биология животных». – 2008. - № 6. – С. 100-103.

5.Корса-Вавилова, Е.В. Опыт применения озоновых технологий при производстве инкубационных яиц / Е.В. Корса-Вавилова, А.К. Османян и др. // Птица и птицепродукты.- 2011.-№1.-С.42-44.

6.Кривопишин, И. Озонизация инкубационных яиц / И. Кривопишин // Птицеводство.-1970.-№5.-С.33-34.

7.Кривопишин, И. Совершенствование технологии инкубации яиц / И. Кривопишин // Птицеводство.-1984.-№11.-С.22-24.

8.Кузнецов, А. Прединкубационная обработка яиц / А. Кузнецов // Птицеводство.- 1989.-№11.-С.23-25.

9.Марков, Ю. Динамика накопления микрофлоры в инкубационных шкафах / Ю. Марков, В. Свириденко, С. Заика // Птицеводство.-1984.-№6.-С.32.

10.Нанос, В. Ценная продукция / В. Нанос // Птицеводство.-1998.- №2.- С.29.

11.Никитина В.А. Изыскание эффективной дрожжевой питательной среды для культивирования бактерий / В.А. Никитина, В.И. Бобрышев, Ф.И. Кафизова // Ученые записки Казанского гос. ветеринарного ин-та им. Н.Э. Баумана. - Казань, 1979. -С. 132-134.

12.Панова, Н.В. Разработка нового стимулятора роста микроорганизмов и изучение его влияния на их биологические свойства на примере некоторых вакцинных штаммов бактерий: дис. …канд. биол. наук: 03.00.23, 03.00.07 / Н.В. Панова. – Ставрополь, 2006. – 173 с.

13.Пигарева, М.Д. Разведение перепелов / М.Д. Пигарева. – М.: Россельхозиздат, 1978.- 80 с.

14.Тимченко, Л.Д. Влияние нового биологически активного препарата «Биокомфорт» на ферментативную активность нейтрофилов лабораторных крыс заключительного периода онтогенеза при повреждении покровных тканей / Л.Д. Тимченко, М.В. Походенко, Е.Г. Затона, И.В. Ржепаковский // Аграрная Россия. – 2010. – № 2. – С. 32-34.

15.Thiele, M. Untersuchungen zur embryotoxizit t von ozon nach einer in ovo-begasung beim huhn: dis. … Dr. med. vet.: 11.10.11 / M. Thiele.-Leipzig, 2011.-129 p.

16. Патент 2197251 РФ. Способ приготовления биостимулятора эмбрионального / Л.Д. Тимченко; И.В. Ржепаковский; В.В. Михайленко; Л.А. Гнездилова; Л.И. Коляда (УР). № 2001110556/13: заявл. 17.04.2001; опубл. 27.01.2003, Бюл. № 3. – Ч. 3.

17.Патент 2283347 РФ Способ получения эмбрионального стимулятора роста микроорганизмов / Л.Д. Тимченко, И.В. Ржепаковский, И.С. Тюменцева, Е.Н. Афанасьев, В.Н. Вакулин, Н.В. Косик (УР). № № 2004115830/13: заявл. 24.05.2004; опубл. 10.09.2006, Бюл. № 25.

Контактная информации об авторах для переписки

Сизоненко Марина Николаевна – аспирант кафедры ботаники, зоологии и общей биологии Института живых систем СКФУ, младший научный сотрудник ПНИЛ «Экспериментальной иммуноморфологии, иммунопатологии и иммунобиотехнологии» E-mail: risha_veresk@mail.ru

Катунина Людмила Семёновна - старший научный сотрудник лаборатории питательных сред ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт».

УДК619:615.9:612

Герунова Л.К., Околелов В.И., Пьянова Л.Г., Вовк А.А.

(ФГБОУ ВПО ОмГАУ имени П.А.Столыпина, ИППУ СО РАН, г.Омск)

ИММУННАЯ РЕАКТИВНОСТЬ КРЫС ПРИ ОСТРОЙ ИНТОКСИКАЦИИ АВЕРСЕКТОМ-2, И КОРРЕКЦИИ ЭНТЕРОСОРБЕНТОМ, МОДИФИЦИРОВАННЫМ БЕТУЛИНОМ

Ключевые слова: Аверсект-2, энтеросорбент, бетулин, крысы, иммунная реактивность.

Введение. В настоящее время во всем мире ежедневно животным вводят более 10 млрд. доз лекарственных средств. На животноводческих предприятиях России практически нет коров, свиней, овец, коз и птиц, которые бы не получали те или иные фармакологические препараты [9]. Особенно широко используют противопаразитарные средства, поскольку в производственных условиях все сельскохозяйственные животные подвергаются ежегодной профилактической противопаразитарной обработке. Учитывая, что большинство противопаразитарных препаратов несет потенциальную опасность и способно вызывать нежелательные реакции у обрабатываемых животных, предъявляют высокие требования по безопасности к данной